

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-086682

(43)Date of publication of application : 29.03.1994

(51)Int.Cl.

C12P 17/06
// (C12P 17/06
C12R 1:685)
(C12P 17/06
C12R 1:66)
(C12P 17/06
C12R 1:665)

(21)Application number : 04-271815

(71)Applicant : KOBE STEEL LTD

(22)Date of filing : 09.10.1992

(72)Inventor : TANIMURA HIROSHI

MIMURA MORIO

TAKAHARA YOSHIMASA

(30)Priority

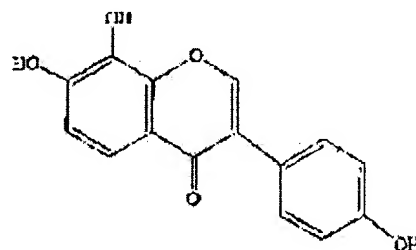
Priority number : 04197019 Priority date : 23.07.1992 Priority country : JP

(54) PRODUCTION OF 4',7,8-TRIHIDROXYISOFLAVONE

(57)Abstract:

PURPOSE: To industrially and advantageously obtain the subject compound useful as an antioxidant, etc., by culturing a microorganism, belonging to the genus *Aspergillus* and having the ability to produce 4',7,8-trihydroxyisoflavone in a culture medium and collecting the resultant product from the culture.

CONSTITUTION: A microorganism, belonging to the genus *Aspergillus* and having the ability to produce 4',7,8-trihydroxyisoflavone (e.g. *Aspergillus niger* IF04414) is inoculated into a culture medium, cultured at 25°C for 7 days, then inoculated into a liquid culture medium and cultured at 28°C for 96hr with a rotary shaker. The resultant culture is subsequently lyophilized and an 80% hydrous acetone is then added to the dried substance thereof. The obtained mixture is stirred and extracted with a homogenizer to separate a residue and an extract by filtration. The obtained extract is concentrated under reduced pressure and the resultant extract is suspended in pure water. Ether is subsequently added to the suspension and



injected into a separating funnel and shaken to collect an ethereal layer. The solvent is distilled away under reduced pressure to efficiently afford the objective 4',7,8-trihydroxyisoflavone expressed by the formula at a low cost.

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-86682

(43)公開日 平成6年(1994)3月29日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 17/06

8931-4B

(C 1 2 P 17/06

C 1 2 R 1:685)

(C 1 2 P 17/06

C 1 2 R 1:66)

審査請求 未請求 請求項の数2(全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-271815

(22)出願日 平成4年(1992)10月9日

(31)優先権主張番号 特願平4-197019

(32)優先日 平4(1992)7月23日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001199

株式会社神戸製鋼所

兵庫県神戸市中央区臨浜町1丁目3番18号

(72)発明者 谷村 博司

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

(72)発明者 三村 精男

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

(72)発明者 高原 義昌

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

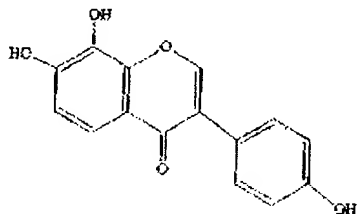
(74)代理人 弁理士 植本 久一

(54)【発明の名称】 4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの製造方法

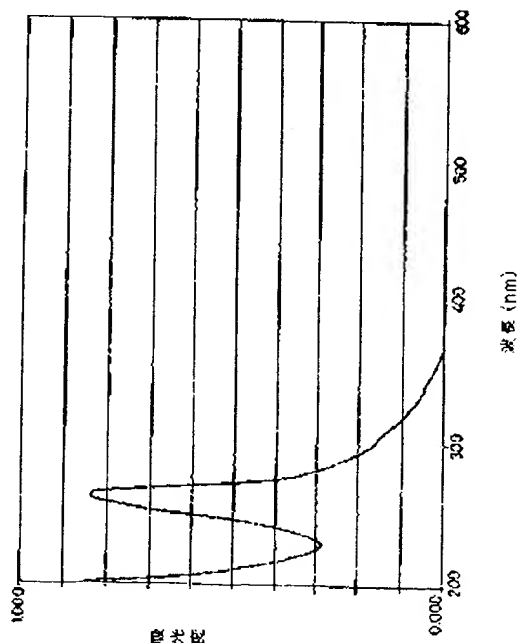
(57)【要約】

【目的】 下式で示される4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを安価で効率よく製造する方法を提供する。

【化1】



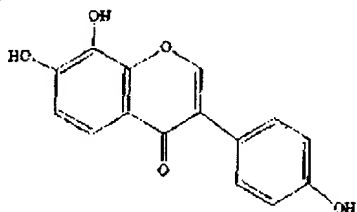
【構成】 アスベルギルス属に属し、4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボン生産能を有する微生物を培養し、培養物から4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを採取する。またダイジン及び/またはダイゼインを含有する完全合成培地に培養することによって、分離精製工程を簡便にすることができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 アスベルギルス属に属し、下式で示される4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボン生産能を有する微生物を培地に培養して、培養物から4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを採取することを特徴とする4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの製造方法。

【化1】



【請求項2】 前記微生物を、ダイジン及び/またはダイゼインを含む完全合成培地に培養して、培養物から4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを採取する請求項1に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

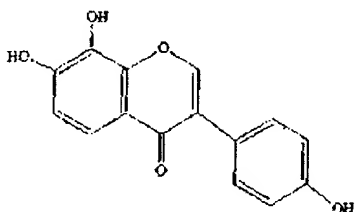
【産業上の利用分野】 本発明は抗酸化剤等として有用な4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンは下式で示される化合物で、イソフラボン類の1つである。

【0003】

【化2】



【0004】 製造方法に関しては、化学合成法はカルマルカルの報告 (Karmarkar, J. Sci. Ind. Res., 20B巻, 344頁 (1961年)) 等があり、天然物からの抽出法としては放線菌の培養液からの分離 (ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス, 42巻, 1344頁, 1989年, 特開平2-124883号公報) 等が知られている。4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンには抗癌活性や抗酸化作用が知られており、そのためより安価に効率よく工業的に製造する方法の開発が望まれていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は以上のような状況に鑑みてなされたものであって、その目的は、

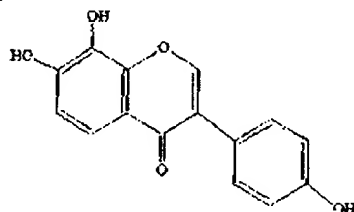
4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを安価で効率よく製造する方法を提供しようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 上記課題を解決することのできた本発明の製造方法は、アスベルギルス属に属し、下式で示される4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボン生産能を有する微生物を培地に培養して、培養物から4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを採取することに要旨を有する。

10 【0007】

【化3】



【0008】 また本発明においては、前記微生物を、ダイジン及び/またはダイゼインを含む完全合成培地に培養して、培養物から4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを採取することが好ましい。

【0009】

【作用】 本発明者らは、4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの製造方法について種々検討した結果、アスベルギルス属に属する微生物が、その培養物中に4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを生産することを見出し、さらには完全合成培地を用いることによって目的物の分離精製が簡便容易に行えることを見出し、

30

本発明を完成したものである。

【0010】 本発明で使用する微生物は、アスベルギルス属に属し、4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボン生産能を有するものであれば特に制限されないが、例えば、アスベルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスベルギルス・ウサミ (*Aspergillus usami*)、アスベルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスベルギルス・フェティダス (*Aspergillus feldus*) 等が挙げられる。これらの微生物の代表例としてアスベルギルス・ニガー IFO 4414が挙げられる。

40

【0011】 これらの微生物の菌学的性質は「バーヂーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー：第8版、ザ・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンズ社出版」に記載されており、これら菌株は公的微生物保存機関から容易に入手できるものである。

【0012】 本発明においては、先ずアスベルギルス属に属し、4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを生産する能力を有する微生物が適当な培地に培養される。これらの微生物の培養においては、通常真菌類を培

50

養する方法が一般的に用いられる。

【0013】培地としては、下記に例示するように、微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、更には必要に応じて無機塩などを含有させた培地が使用される。炭素源：グルコース、フラクトース、マルトース、キシロース、マンニット、グリセリン、澱粉、デンプン、デキストリン、コーン・スチープ・リカー、ポテトエキス等

窒素源：ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、大豆蛋白分解物、カゼイン、アミノ酸、尿素、N₂-アミン、コーン・スチープ・リカー、フィッシュミール、硝酸塩、アンモニウム塩等

必要に応じて：ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩等の無機塩類、その他これら微生物の生育及び4'、7、8-トリヒドロキシイソフラボンの生成を促進する重金屬、微量栄養源、発育促進物質等

【0014】また本発明者らが培地に関して種々検討した結果、下記に例示するように、ダイジン及び/またはダイゼインを含有すると共に微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、更には必要に応じて無機塩などを含有する完全合成培地を使用することによって分離精製工程が簡便になることが判明した。

炭素源：グルコース、フラクトース、マルトース、キシロース、マンニット、グリセリン、デンプン、デキストリン等

窒素源：硝酸塩、アンモニウム塩等

必要に応じて：ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩等の無機塩類、その他これら微生物の生育及び4'、7、8-トリヒドロキシイソフラボンの生成を促進する重金屬、微量栄養源、発育促進物質等

ダイジン及び/またはダイゼインの添加濃度：0.01～5.0mg/mlの範囲。

【0015】また上記いずれの培地を用いる場合でも好ましい培養条件として下記のものが挙げられる。

培養：振とうまたは通気攪拌等の好気的条件下で行うのが望ましい。

培養温度：20～35℃、好ましくは25～30℃の範囲。

培地pH：pH5～7程度の弱酸性が好ましい。

培養時間：液体培養の場合通常1～7日間、好ましくは培養液中の4'、7、8-トリヒドロキシイソフラボンの産生量が最大に達したときに培養を終了すればよい。

【0016】尚、これらの培地組成等の培養条件は、使用する微生物の種類や外部の条件等に応じて好ましい結果が得られる様適宜調節、選択されることは言うまでもない。また、液体培養において発泡がある場合は、シリコンオイル、糖物油、界面活性剤等の消泡剤を適宜使用すればよい。

【0017】このようにして得られた培養物の全体、或は菌体若しくは培養液から4'、7、8-トリヒドロキシイソフラボンを採取することができる。まず培養物全体から採取する場合は、培養物を凍結乾燥してその凍結乾燥物を含水アセトンなどの含水親水性有機溶媒で抽出し、得られた抽出液を減圧濃縮する。得られた粗物質は更に、脂溶性物質の精製に通常用いられる公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィーによって精製することができる。またダイジン及び/またはダイゼインを含有する完全合成培地で培養する場合、得られた抽出物から高速液体クロマトグラフィーによってワンステップで精製することができる。また菌体から採取する場合には、まず遠心分離によって菌体と培養液とに分離する。得られた菌体から前記と同様の方法で抽出、分離、精製して4'、7、8-トリヒドロキシイソフラボンを得ることができる。

【0018】また、培養液から4'、7、8-トリヒドロキシイソフラボンを採取するには、得られた培養液を酢酸エチル等の非親水性有機溶媒で抽出するか、或は活性炭、アルミナ、多孔性合成高分子、イオン交換樹脂等の吸着剤に吸着させて酢酸エチルなどの溶出溶媒で溶出し、得られた抽出液または溶出液を減圧濃縮し、前記と同様の方法で分離精製することができる。

【0019】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、下記実施例は本発明を制限するものではなく、前・後記の趣旨を逸脱しない範囲内で変更実施することは全て本発明の技術的範囲に包含される。

【0020】実施例1

<微生物の培養>微生物としてアスペルギルス・ニガーIFO 4414を用いた。

(a) グルコース2% (重量%の意味、以下同じ)、肉エキス0.3%、ポリペプトン0.2%、塩化ナトリウム0.2%、酵母エキス0.2%を含む寒天斜面培地上でアスペルギルス・ニガー IFO 4414を25℃7日培養した。このスラント1本の菌体を500ml容量三角フラスコ中の、液体培地A (大豆粉10%含有、pH6.0) 100mlに接種し、ロータリーシェーカー (振幅6cm、毎分180回転) にて28℃で96時間培養して粗母を得た。

(b) 粗母と同様に調製した500ml容量三角フラスコ20本を滅菌し、上記方法で得られた粗母3mlずつを無菌操作にて接種し、ロータリーシェーカー (振幅6cm、毎分180回転) を用いて28℃で96時間培養し、培養物約2000mlを得た。

【0021】<培養物からの4'、7、8-トリヒドロキシイソフラボンの抽出>得られた培養物を凍結乾燥し、その乾燥物に80%含水アセトンを添加し、ホモジナイザーで攪拌、抽出した。遠心によって残渣と抽出物を分離し、その抽出物を減圧濃縮して抽出物を2.4.9

g得た。

<溶媒転溶による4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの精製>得られた抽出物を純水に懸濁した。それにエーテルを添加し、分液漏斗に注入して振とうして振とうした。静置して2層に分け、エーテル層を採取して溶媒を減圧留去して4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを含有する油状物質を3.2g得た。

【0022】<シリカゲルクロマトグラフィーによる4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの精製>得られた油状物質を予めクロロホルムを用いて充填された内径3.0mm、長さ400mmの「シリカゲル60」(メルク社製)カラムに吸着させ、クロロホルムからメタノールに段階的に変化させる溶出溶媒を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出液のうち4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを含むフラクションを集めて減圧濃縮し、純度7.5%程度の4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボン含有画分を463mg得た。

【0023】<高速液体クロマトグラフィーによる4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの単離>得られた4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの純品を得るために次の高速クロマトグラフィーにより分離精製した。高速液体クロマトグラフィーは、送液ポンプとして「LC-6AD」(島津製)、検出器として「SPD-M6A」(島津製)、カラムはオクタデシル化シリカゲルの「Develosil ODS-10」(内径2.0mm、長さ250mm(野村化学製)を用いた。上記で得た4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボン含有画分462.6mgをメタノール2mlに溶解し、200μlずつ10回に分けてサンプルとして注入した。展開溶出溶媒としてメタノール10mMリン酸緩衝液(2:3)混合溶媒を用い、波長260nmの紫外線吸収で4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンに該当するピークを集めた。この画分を減圧濃縮し、純水に懸濁してセブパック・カートリッジC18(ウォーターズ製)に吸着させて脱塩を行い、メタノールで溶出させた。この溶出物を減圧濃縮して4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの純品34.6mgを得た。

【0024】尚、上記のようにして得られた純品の構造は、各種機器分析(UV、IR、FAB-MS、NMR等)結果から4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンであることを確認した。即ち、このものの紫外線吸収スペクトルは、260nmに極大を有していた。赤外線吸収スペクトルは、3460, 3200, 1650, 1580, 1560, 1510cm⁻¹に吸収極大を持っていた。また高速電子衝突式マススペクトル(FAB-MS)では分子イオンピークは271であり、このことから分子量は270であると判明した。これらの分析結果を図1~5に示す。

【0025】実施例2

<微生物の培養>微生物としてアスペルギルス・ニガーIFO 4414を用いた。

(a) グルコース2% (重量%の意味、以下同じ)、肉エキス0.3%、ポリペプトン0.2%、塩化ナトリウム0.2%、酵母エキス0.2%を含む寒天斜面培地上でアスペルギルス・ニガー IFO 4414を25℃7日培養した。このスラント2白金耳の菌体を500ml容量三角フラスコ中のツァベック・ドックス培地(硝酸ナトリウム0.2%, リン酸第二カリウム0.1%, 硫酸マグネシウム0.05%, 塩化カリウム0.05%, 硫酸第一鉄0.001%, グルコース3%, pH 6.0)100mlに接種し、ロータリーシェーカー(振幅6cm、毎分180回転)にて28℃で96時間培養して種母を得た。

(b) ダイゼイン0.05mg/mlを添加したツァベック・ドックス培地100mlをいれた500ml容量三角フラスコ20本を滅菌し、上記方法で得られた種母3mlずつを無菌操作にて接種し、ロータリーシェーカー(振幅6cm、毎分180回転)を用いて28℃で96時間培養し、培養物約2000mlを得た。

【0026】<培養物からの4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの抽出>得られた培養物を凍結乾燥し、その乾燥物に80%含水アセトンを添加し、ホモジナイザーで攪拌、抽出した。濾過によって残渣と抽出物を分離し、その抽出物を減圧濃縮して抽出物を200mg得た。

【0027】<高速液体クロマトグラフィーによる4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの単離>得られた抽出物から4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの純品を得るために次の高速クロマトグラフィーによって分離精製した。高速液体クロマトグラフィーは、送液ポンプとして「LC-6AD」(島津製)、検出器としてフォトダイオードアレイ「SPD-M6A」(島津製)、カラムはオクタデシル化シリカゲルの「Develosil ODS-10」(内径2.0mm、長さ250mm)(野村化学製)を用いた。上記で得た抽出物200mgをメタノールに溶解し、サンプルとして注入した。展開溶出溶媒としてメタノール10mMリン酸緩衝液混合溶媒を用い、メタノール濃度を30%-60%に直線的に変化させて溶出を行い、波長260nmの紫外線吸収で4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンに該当するピークを集めた。この画分を減圧濃縮し、純水に懸濁してセブパック・カートリッジC18(ウォーターズ製)に吸着させて脱塩を行い、メタノールで溶出させた。この溶出物を減圧濃縮して4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの純品30mgを得た。

【0028】尚、上記のようにして得られた純品は、実施例1において得られた4', 7, 8-トリヒドロキシ

イソフラボン純品と高速液体クロマトグラフィー分析による保留時間及びUVスペクトルを比較して、その結果から4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンであることを確認した。これらの分析結果を図6～10に示す。

【0029】

【発明の効果】本発明は以上のように構成されており、4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンを安価で効率的に製造する方法を提供できるようになった。この4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンは抗酸化剤 10 等として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの紫外線吸収スペクトルである。

【図2】4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの高速電子衝突質量スペクトル(FAB-MAS)である。

【図3】4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの*

* $^1\text{H-NMR}$ スペクトルである。

【図4】4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルである。

【図5】4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの赤外線吸収スペクトルである。

【図6】高速液体クロマトグラフィーでのダイゼインの溶出プロファイルである。

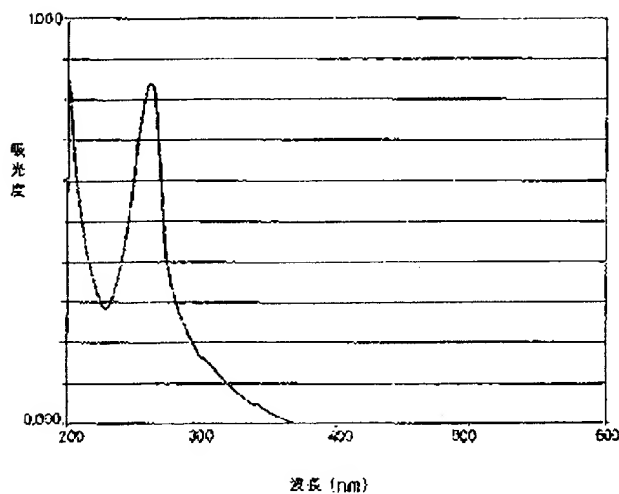
【図7】高速液体クロマトグラフィーでの4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンの溶出プロファイルである。

【図8】高速液体クロマトグラフィーでのダイゼイン添加ツバベック・ドックス培地培養抽出物の溶出プロファイルである。

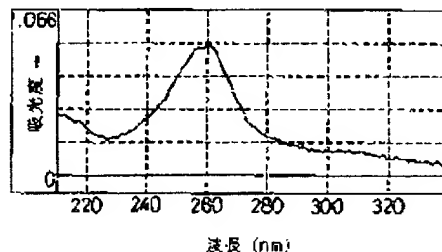
【図9】4', 7, 8-トリヒドロキシイソフラボンのUV吸収スペクトルである。

【図10】図7中の保留時間17分付近のピークのUV吸収スペクトルである。

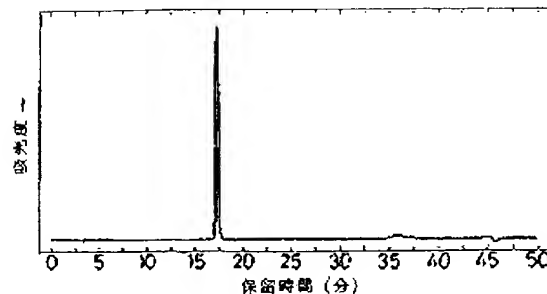
【図1】



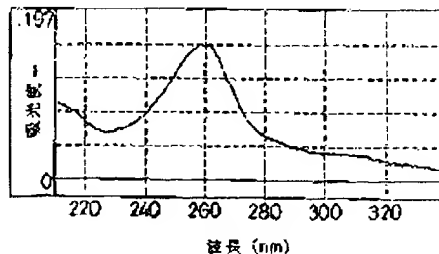
【図9】



【図7】



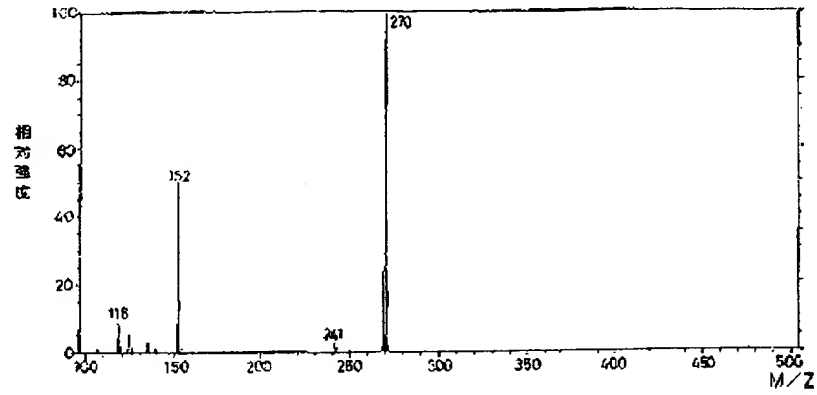
【図10】



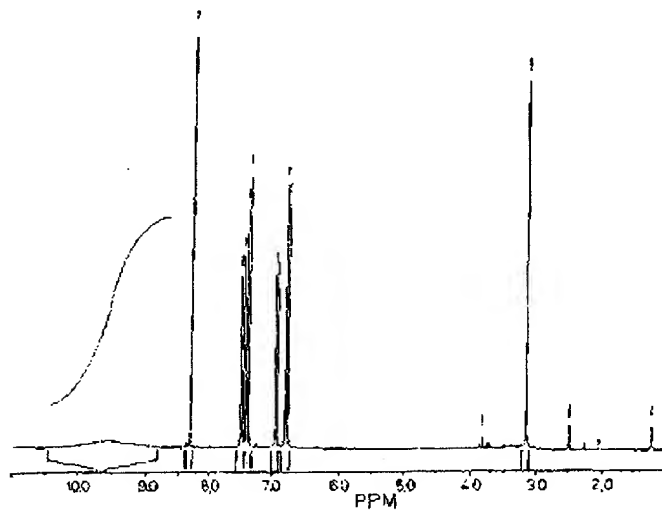
(6)

特開平6-86682

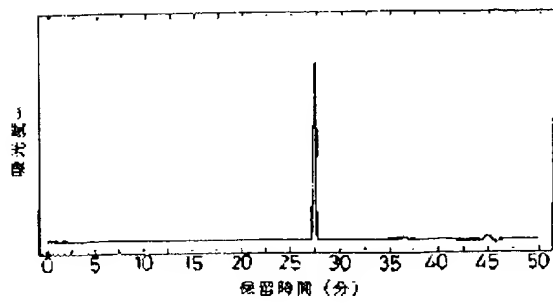
【図2】



【図3】

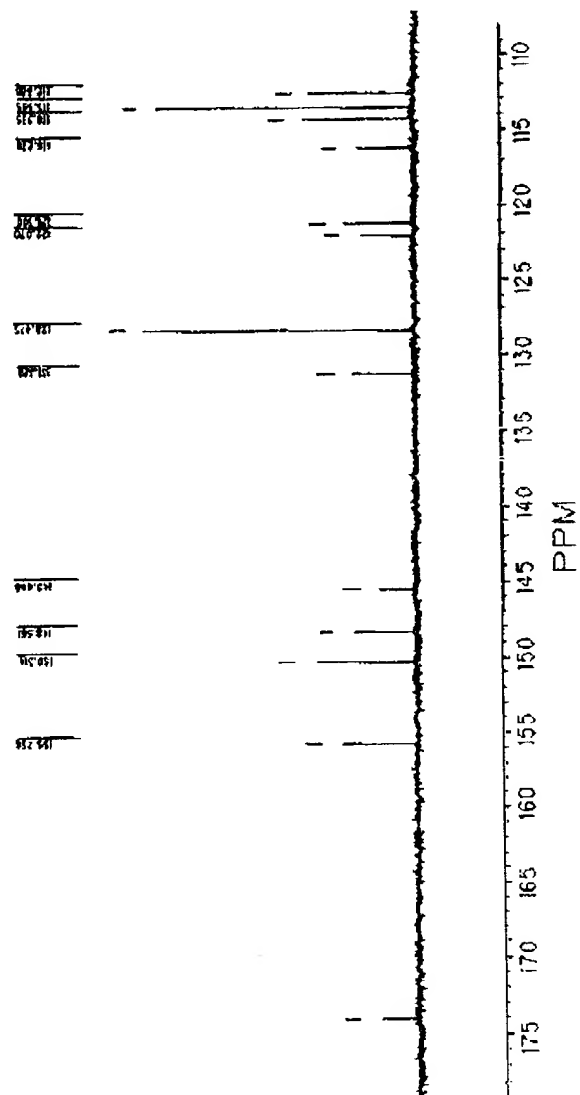


【図6】

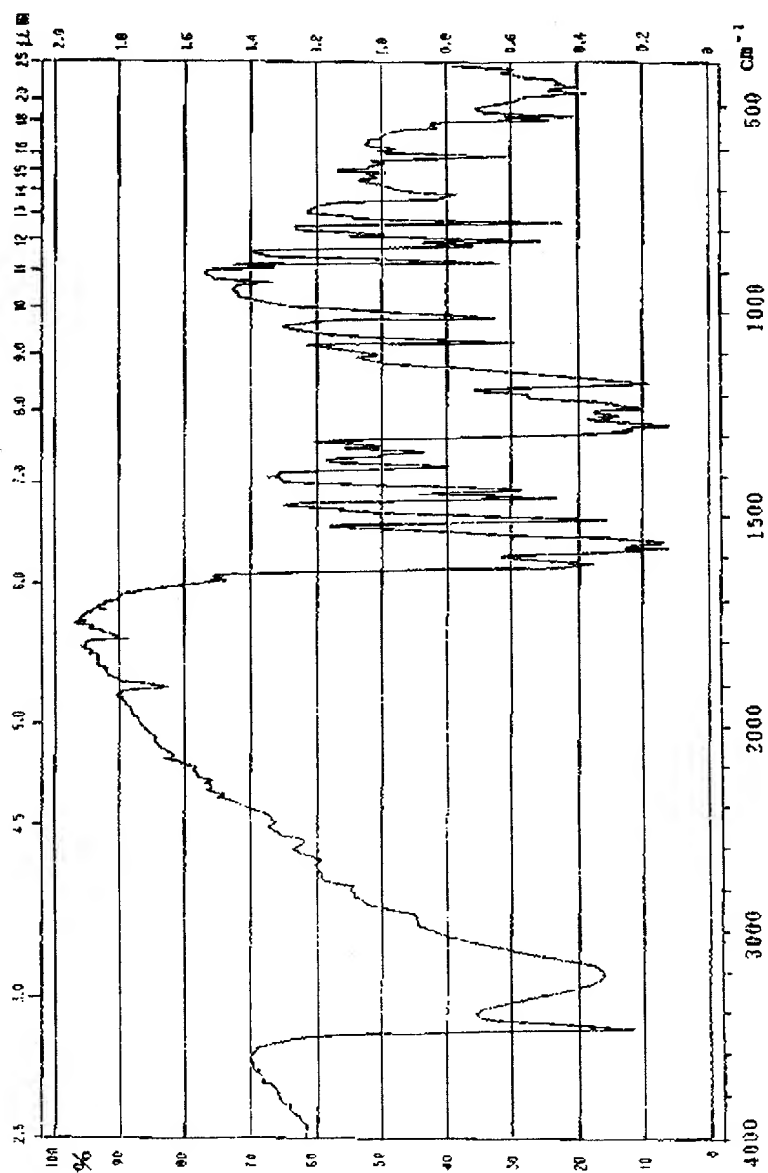


(7)

【図4】



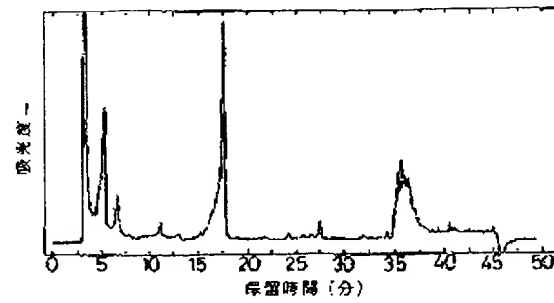
【図5】



(9)

特開平6-86682

【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
(C12P 17/06
C12R 1:665)

識別記号 庁内整理番号 F I

技術表示箇所